



日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

RECEIVED
MAR 14 2001
TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1997年 9月 8日

出 願 番 号

Application Number:

平成 9年特許願第260972号

出 願 人

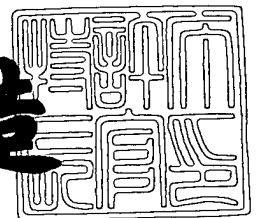
Applicant (s):

株式会社中外分子医学研究所

2001年 2月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3006155

【書類名】 特許願

【整理番号】 C2-906

【提出日】 平成 9年 9月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 トランスポーター遺伝子

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 根津 淳一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 奥 飛鳥

【特許出願人】

【識別番号】 596102791

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代表者】 川口 勉

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710621

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスポーター遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項2】 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項3】 配列番号：3に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を含み、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項4】 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項5】 請求項1または3に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項6】 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項7】 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項8】 請求項5から7のいずれかに記載のDNAが挿入されたベクター。

【請求項9】 請求項5から7のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

【請求項10】 請求項9に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1から4のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項11】 配列番号：1に記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項12】 配列番号：3に記載のタンパク質に結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞外から細胞内へ、あるいは細胞内から細胞外への物質の輸送に関与するタンパク質であるトランスポーターに関する。

【0002】

【従来の技術】

栄養素や内因性物質の細胞内への取り込み機構において、生体膜に存在する多種の輸送担体（トランスポーター）の関与と、その輸送機構が最近明らかになりつつある(Tsuiji, A. and Tamai, I., Pharm. Res., 13, 963-977, 1996.)。これらのトランスポーターには、輸送される物質の構造認識能が備わっており、物質を選択的に輸送するが、比較的その構造認識が広いトランスポーターの場合、本来は生体異物である医薬品などについても誤認識し、積極的に細胞内へ輸送してしまうと考えられる。基本的に薬物の生体膜透過は、その分子サイズ、脂溶性、水素結合能などの物理化学的特性に依存する単純拡散に従っており、特にイオン性薬物の場合には、非解離型分子のみがpH-分配仮説に従って生体膜を透過すると考えられていた。しかし、細胞内外の効率的な物質交換活性が必要な小腸、腎尿細管、胎盤、脳脈絡叢の上皮細胞や、肝実質細胞、血液脳関門などでは、多くの薬物は単純拡散以外の特異的機構、つまりトランスポーターによる能動的な輸送により細胞膜を透過することが明らかとなってきた(玉井郁巳、辻彰：ファルマシア、31、493-497、1995.、齋藤秀之、乾賢一：医学のあゆみ、179、393-397、1996.、玉井郁巳：薬物動態、11、642-650、1996.)。例えば、非エステル型の経口用 β -ラクタム抗生物質は生理的pHにおいては両性または負に荷電し、脂溶性は極めて低いにも関わらず、腸管からの吸収は良好であることが知られている。単離膜小胞系を用いた輸送研究により、これらの薬物の吸収過程には、刷子縁膜に局在する H^+ 駆動型ペプチドトランスポーターが関与していることが示されるようになった(Okano, T. et al., J. Biol. Chem. 261, 14130-14134, 1986.)。ペプチド輸送系は、ジあるいはトリペプチドを認識するが、テトラペプチド以上

は認識できず、ペプチドサイズについては極めて厳密であるものの、非天然のアミノ酸からなるペプチドは認識するといった比較的広い基質認識性を持つ。 β -ラクタム抗生物質のペプチドトランスポーターによる輸送も、やはりこの広い基質認識性ゆえの誤認識による輸送であり、臨床的にはそれを図らずも利用していたことになる(Tsuji, A., American Chemical Society (eds. Taylor, M. D., Amidon, G. L.), Washington, D. C., 101-134, 1995.)。さらには、脂溶性の高い脂肪酸のような物質の生体膜透過においても、トランスポーターが関与している可能性が報告されている(Schaffer, J. and Lodish, H., Cell, 79, 427-436, 1994.)。

【0003】

ところで、様々なトランスポーターは各臓器、細胞が持つ生理的役割に応じて備わっているはずであり、その分布や機能には臓器特異性が期待される。従って、薬物動態に臓器選択性をもたらす手法としてトランスポーターを利用することが期待できる。すなわち、トランスポーターを利用した臓器特異的薬物デリバリー(DDS)が可能であると考えられる。また、脂溶性をあげることによる単純拡散に頼った薬物の吸収性改善は、肝臓における初回通過効果を増大させたり、臓器移行性を非特異的に増大させる可能性が高い。しかし、トランスポーターの基質特異性を利用したドラッグデザインを行うことにより、脂溶性とは無関係に薬物の吸収性を高めることも可能であると考えられる(林喜代美 他: Drug Delivery System, 11, 205-213, 1996.)。このような目的のためには、多くのトランスポーターを分子レベルで同定し、その性質についての詳細な解析を行うことが必須であるが、トランスポーターはその生化学的な取り扱いの難しさと、機能測定 of 複雑さから、膜生理学的な研究の多さに比較し、分子レベルでの同定が非常に遅れている。

【0004】

最近になり、外来遺伝子発現系であるアフリカツメガエル(*Xenopus*)卵母細胞を用いた発現クローニング法によりいくつかのトランスポーターのcDNAがクローニングされるようになり、構造上の類似性が存在することが明らかになってきた(Fei, Y. -J. et al., Nature, 368, 563-566, 1994.)。例えば、1994年にKoeps

ellらによって、基底膜型と推定される有機カチオントランスポーターOCT1が発現クローニング法によってクローニングされた(Grundemann, D. et al., Nature, 372, 549-552, 1994.)。その後、OCT1の配列をもとにしたホモロジークローニングによってOCT2が同定された(Okuda, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 224, 500-507, 1996.)。OCT1とOCT2はお互いに67%という非常に高い相同性を示すが、その尿細管における分布は異なっており、OCT2は主に管腔側に局在していると考えられている(Grundemann, D. et al., J. Biol. Chem. 272, 10408-10413, 1997.)。両者とも腎臓に強い発現が見られるが、OCT1の場合はそれ以外にも肝臓、結腸、小腸に発現が存在するのに対し、OCT2は腎臓に特異的であり、組織分布も異なっている。さらに、腎臓に特異的な遺伝子を検索する過程で同定されたNKT(Lopez-Nieto, C. E. et al., J. Biol. Chem. 272, 6471-6478, 1997.)と、肝臓洞様毛細血管の膜タンパクを認識する抗体の抗原としてクローニングされたNLT(Simonson, G. D. et al., J. Cell Sci. 107, 1065-1072, 1994.)がともに、OCT1,OCT2に高い相同性を示すことが明らかとなり、これらは一つのファミリー(OCTファミリー)を形成しているものと考えられる。これら以外には、Drosophilaと、C. elegans由来の同程度のホモロジーを示す遺伝子がデータベースには登録されており(それぞれGenBank accession No.Y12400, Z83228)、やはりこのファミリーに属するものと考えられる。このようにトランスポーターについての分子レベルでの同定についてはわずかな報告例しかなく、いまだ臨床上有用な多くの未知のトランスポーターが存在していると考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なトランスポーターを提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、胎児組織に特異的、あるいはより強く発現している遺伝子(fetal gene)の中には、癌をはじめとする各種疾患に関与する遺伝子が存在するとの作業仮説のもと、サブトラクション法によって作製した胎児遺伝子(fetal gene)ライブラリーのランダムシーケンシングによるスクリーニングを行ってきた

。本発明者等はこの過程において、最近クローニングされた有機カチオントランスポーターファミリータンパクと有意な相同性を示す未知の遺伝子の存在を見いだした。本発明者等は、この遺伝子のクローニングを行い、その構造の解析を行った結果、該遺伝子が全体に渡り有機カチオントランスポーターファミリータンパク質と非常に高い相同性を有する新規なタンパク質をコードしていることを見いだした。さらに、本発明者等は、単離した遺伝子がコードするタンパク質のトランスポーター活性につき検討を行った結果、該タンパク質が実際に種々の有機カチオンのトランスポーターとして機能することを見いだした。

【0007】

即ち、本発明は、新規なトランスポーターに関し、より具体的には、

(1) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(2) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(3) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を含み、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(4) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(5) (1) または (3) に記載のタンパク質をコードするDNA、

(6) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA、

(7) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA、

(8) (5) から (7) のいずれかに記載のDNAが挿入されたベクター、

(9) (5) から (7) のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転

換体、

(10) (9)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)から(4)のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、

(11) 配列番号：1に記載のタンパク質に結合する抗体、

(12) 配列番号：3に記載のタンパク質に結合する抗体、

に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明は、新規なトランスポータータンパク質に関する。本発明者等が単離した新規なヒトトランスポーターcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：2および配列番号：4に示す。また、これらcDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1および配列番号：3に示す。本発明のトランスポータータンパク質に含まれるこれら2つのタンパク質のアミノ酸配列は全体に渡り、約72%という非常に高い相同性を示し、ともにグルコーストランスポーターなど様々なタイプのトランスポーターに存在するコンセンサス配列[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly]-Xaa<2>-[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala]-[Asp, Glu]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala])(Maiden, M. C. et al., Nature, 325, 641-643, 1987.)を保持していた。実際に、配列番号：1に記載のタンパク質は、様々な有機カチオンを輸送する活性を有していた。

【0009】

本発明のトランスポータータンパク質としては、有機カチオンを輸送する活性を有すれ足り、該活性を有する限り有機カチオン以外の他の物質を輸送する活性をさらに有するものも含まれる。有機カチオンとしては、例えば、TEA、カルニチン、キニジン、ピリラミンが挙げられる。また、細胞外から細胞内へ有機カチオンを輸送する活性を有するもののみならず、細胞内から細胞外へ有機カチオンを輸送する活性を有するものも含まれる。

【0010】

本発明のトランスポータータンパク質は、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組換えタンパク質は、例えば、後述するように本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。一方、天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述の本発明の抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、本発明のタンパク質の発現の高い腎臓やHeLa S3などの癌細胞株から単離することが可能である。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体であれば、例えば、本発明のタンパク質をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞にし、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のタンパク質に対する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。なお、得られた抗体を人体に投与する目的で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト型化抗体またはヒト抗体を用いると有効である。抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部位を既存のヒト抗体に移植するCDR graft法などが挙げられる。また、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウスを免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製することもできる。

【0011】

また、当業者であれば、公知の方法を用いて配列番号：1または3に記載のト

ランスポータータンパク質中のアミノ酸の置換などを適宜行い、これと実質的に同一の機能を有するタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加により配列番号：1または3に記載のタンパク質に対してアミノ酸配列が改変された改変体であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム（GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland）、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法（Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367）、Kunkel法（*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)）などが挙げられる。なお、アミノ酸の置換は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。置換、欠失、付加がなされる部位は本発明のタンパク質の活性が保持される限り特に制限はない。タンパク質のランスポーター活性は、例えば、後述の実施例6に記載の方法により検出することが可能である。

【0012】

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., *Molecular Cloning* 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）などを用いて、配列番号：2または4に記載のDNA配列（またはその一部）を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のタンパク質と実質的に同一の機能を有するタンパク質を得ることも常套手段である。即ち、当業者であれば、配列番号：2または4に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質を調製することが可能であり、これらのタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。ハイブリダイズするDNAを他の生物から単離する場合には、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウシなどが用いられ、特に腎臓などの組織が単離に適している。これにより単離される配列番号：1または3に記載のタンパク質と実質的に同一の機能を有するタンパク質をコードするDNAは、通常、配列番号：2または配列番号：4に記載のDNAと高い相同性を有する。高い相同性とは、配列番号：2または配列番号：4に記載のDNAと、少なくとも70%以上、好ましくは少なくとも8

0%以上、さらに好ましくは少なくとも90%以上の配列の同一性を指す。

【0013】

このようなDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件の例を示せば、以下の如くである。即ち、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、37℃から55℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行う。より好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、60℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、60℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行う。さらに好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、0.1xSSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行う。

【0014】

また、本発明は、上記本発明のトランスポータータンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、cDNAでも、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、上記のように配列番号：1または3に記載のタンパク質と実質的に同一の機能を有するタンパク質を単離するために用いる他、本発明のタンパク質を組換えタンパク質として生産するために利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：2または4に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌（E.coli）が挙げられる。ま

た、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3 (Invitrogen社製) やpEF-BOS (Nucleic Acids.Res.1990,18(17),p5322) などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL社製) などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」(Invitrogen社製) などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1 (Pharmacia社製)、「QIA express system」(Qiagen社製) などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP(ペーリンガーマンハイム社製)を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法など用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

【0015】

本発明のDNAは、また、本発明のタンパク質の活性異常や発現量異常に起因する疾患に対する遺伝子治療に用いることも可能である。遺伝子治療に用いる場合には、本発明のDNAをアデノウイルスベクター（例えば、pAdexLcw）やレトロウイルスベクター（例えば、pZIPneo）などに挿入して、生体内に投与する。投与方法は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。また、アンチセンス合成DNAを生体内に直接、または上記ベクターに挿入して投与して治療を行うことも可能である。

【0016】

本発明の応用として、本発明のトランスポータータンパク質を利用した、薬物の体内吸収、体内動態の制御が挙げられる。本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を詳細に解析することにより、このトランスポーターによって輸送され得る薬剤のドラッグデザインが可能であり、これにより本発明のトランスポータータンパク質を介して薬物の体内吸収を高めることができると考えられる。デザインされる薬物には従来の脂溶性をあげるような修飾は不要であるため、水溶性の扱いやすい薬物が迅速かつ効率的に開発できるようになると考えられる。また開発された薬物の吸収は基本的に本発明のトランスポータータンパク質の

生体内分布に従うと考えられるため、臓器特異的な薬物の送達が可能になるかもしれない。特に本発明のトランスポータータンパク質の体内分布が、標的臓器と一致するような薬物の場合、理想的なドラッグデリバリーシステム(DDS)となるであろう。また、他のトランスポーターによる薬物の吸収を期待しているが、本発明のトランスポータータンパク質による吸収は望ましくない場合、本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を考慮に入れたドラッグデザインを行うことにより、他のトランスポータータンパク質に選択的な薬物の創造が行えると考えられる。本発明のトランスポータータンパク質は腎臓に存在するため、逆に本発明のトランスポータータンパク質によって体外へ排出されやすい薬物を設計することにより、腎毒性等を軽減することが可能であるかもしれない。

【0017】

また、本発明の応用として、本発明のトランスポータータンパク質そのものを標的とした薬物の開発も考えられる。栄養物質の吸収機構として、あるいは薬物や生体内代謝物の排泄機構としてのトランスポーターの重要性を考えると、その機能が損なわれること、または異常に亢進することに起因する疾患が存在する可能性が考えられる。そのような疾患に対しては、本発明のトランスポータータンパク質の機能を阻害、あるいは亢進する薬剤や、本発明のトランスポーター遺伝子の発現量や、タンパク量を調節するするような薬剤が効果的であろう。また、上記のような遺伝子治療も有効であろう。

【0018】

本発明のトランスポータータンパク質は種々の癌細胞株において発現しており、腫瘍細胞において本発明のトランスポータータンパク質が薬物を細胞内へ輸送し得る可能性がある。この場合には、本発明のトランスポータータンパク質によってより吸収されやすい抗腫瘍薬が創造できると考えられる。あるいは逆に、本発明のトランスポータータンパク質による物質の細胞外へ輸送、排出する機構が、腫瘍細胞においては抗腫瘍剤の排出として働き、腫瘍細胞が薬剤に対する抵抗性を獲得する可能性も考えられる。本発明のトランスポータータンパク質が腫瘍の薬剤耐性機構に関与しているならば、本発明のトランスポータータンパク質阻害剤は抗腫瘍効果を発揮し得るかもしれない。

【0019】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0020】

【実施例】

【実施例1】 サブトラクションライブラリーの作製

サブトラクションライブラリーはPCR-SelectTM cDNA Subtraction kit (CLONT ECH)を用い、Luda Diatchenkoらの方法(Diatchenko, L. et al., Proc. Natl. A cad. Sci. USA, 93, 6025-6030, 1996.)に基本的に従って作製した。

【0021】

まずヒト胎児肝臓由来polyA⁺ RNA及びヒト成人肝臓由来polyA⁺ RNAよりMMLV逆転写酵素を用いた標準的な方法で二本鎖cDNAを合成した。つぎにT4 DNAポリメラーゼによりこのcDNA末端を平滑化し、さらにRsaIにより切断した。胎児肝臓由来cDNA(tester)の一部を2分割し、アダプター1とアダプター2(表1)をそれぞれ別々にライゲートした。これにそれぞれ120倍量の成人肝臓由来cDNA(driver)を加え、熱変性を行ったあと68℃で8時間の1次ハイブリダイゼーションを行った。つぎにこれを熱変性せずに混合し、さらに熱変性した過剰量のdriverを加え68℃で約16時間の2次ハイブリダイゼーションを行った。これを希釈用バッファーにて希釈し、75℃で7分インキュベートし、アダプターの短い方の鎖を取り除いたものをPCRの鋳型として用いた。アダプターに対応するプライマーであるPCRプライマー1(5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3' / 配列番号: 5)、2(5' TGTAGCGTG AAGACGACAGAA 3' / 配列番号: 6)を用いたPCRを行うことにより、両端に異なるアダプターを持ったcDNA(サブトラクトされたcDNA)のみを選択的に増幅した(サプレッションPCR)。これの一部を鋳型とし、PCRプライマー1、2のさらに内側に位置するプライマーであるNested PCRプライマー1(5' TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAG GT 3' / 配列番号: 7)と2(5' AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT 3' / 配列番号: 8)を用いたPCRを行うことにより、さらに選択性を増した生成物を得た。この生成物をQIAquick PCR Purification kit(QIAGEN)を用いて精製し、pT7Blue-Tベクター(Novagen)にTAクローニング法によりクローニングし、サブトラクションライブ

【0 0 2 2】

【表 1】

アダプター-2 5' TGTACCGTGAAGACGACAGAAAAGGGCGTGCTGCCGAGGGCGGT 3'
3' GCCTCCCGCCA 5'

fetal geneの解析を目的に、胎児肝臓由来サブトラクショナルライブラリーの、ランダムシーケンシングによるスクリーニングを行った。得られたEST(Expressed Sequence Tag)のホモロジーサーチ(Blastx)による解析から、既知の有機カチオントランスポーターであるOCT1(Grundemann, D. et al., Nature, 372, 549-552, 1994.)、OCT2(Okuda, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 224, 500-507, 1996.)、及びそのファミリータンパク (OCTファミリータンパク) と高い相同性を示すアミノ酸配列をコードするクローン、fls631(292bp)が見いだされた。このクローンの配列は新規なものであり、新規のトランスポーター遺伝子由来の断片である可能性が推測されたことから、この遺伝子の全オープンリーディングフレーム(ORF)を含むcDNAのクローニングを行った。

【0 0 2 3】

胎児肝臓由来サブトラクションライブラリーより得られたfls631オリジナルクローンをプローブとし、human fetal liver 5'-stretch cDNA ライブラリー(C LONTECH)のスクリーニングを行った。fls631オリジナルクローンのインサートを、M13 P4-22とM13 P5-22を用いたPCRにより増幅し、これをReady-to Go DNA labelling beads (Pharmacia)を用いたランダムプライマー法により [α - 32 P] dCTPでラベルし、プローブとした。ハイブリダイゼーションはExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、68℃で、メーカー推奨の方法に従い行った。また

、最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1% SDS、50℃で行った。約 5×10^5 個のファージクローンをスクリーニングしたところ、最終的に7個の陽性クローンが単離された。これらのクローンのインサートcDNAを λ gt10ベクターの配列より設計したベクタープライマー(GT10 S1 5' CTTTGTGCAAGTTCAGCCT 3' / 配列番号: 9, GT10 A1 5' AGAGGTGGCTTATGAGTATTTCTT 3' / 配列番号: 10)、あるいは解読されたcDNAの配列より設計したプライマーを用いたPCRによって増幅し、その産物を直接シーケンシングすることにより、塩基配列を決定した。一部の増幅が困難な領域については7-deaza dGTPを基質塩基として用いたPCRによる増幅を行った(McConlogue, L. et al., Nucleic Acids Res. 16, 9869, 1988.)。

【0024】

約 5×10^5 個のファージクローンをスクリーニングしたところ、最終的に7個の陽性クローンが単離された。これらのクローンのインサートcDNAの塩基配列を決定した結果、fls631遺伝子は、551アミノ酸(推定分子量約62,000)からなるORFをコードし得る配列を持つことが明らかとなった。この全アミノ酸配列を用いてデータベースサーチを行ったところ、fls631オリジナルクローンに対応する部位のみではなく、全体に渡って既知のOCTファミリータンパクと非常に高い相同性を示すことが確認された。fls631とOCTファミリータンパク(ラットOCT1、ラットOCT2、マウスNKT(Lopez-Nieto, C. E. et al., J. Biol. Chem. 272, 6471-6478, 1997.)、ラットNLT(Simonson, G. D. et al., J. Cell Sci. 107, 1065-1072, 1994.)のアミノ酸配列との比較を図1に示す。fls631はアミノ酸レベルでこれらのファミリータンパクと、それぞれ32%、33%、28%、28%の相同性を示した。また、Kyte & Doolittleの計算式(Kyte, J. and Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. 157, 105-132, 1982.)によって得られる疎水性プロフィールは、OCTファミリータンパクのものと非常に類似しており、11-12個の膜貫通領域と思われる疎水性領域が認められた(図2)。また、この配列中には1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列([Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly]-Xaa<2>-[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala]-[Asp, Glu]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala])が存在した(160-175)。このコンセンサス配列は

、哺乳類細胞におけるグルコースのトランスポーターであるGLUT1～GLUT7に存在するコンセンサス配列であり、グルコーストランスポーター以外にも、様々なタイプのトランスポーターに存在することが知られている(Maiden, M. C. et al., *Nature*, 325, 641-643, 1987.)。fls631のアミノ酸配列中には、さらに、N型糖鎖が付加され得る配列(N-X-[ST])が4箇所(57-59, 64-66, 91-93, 304-306)見られる。OCTファミリーにおいても同様にN型糖鎖による修飾の可能性が示唆されているが、生化学的な証明はなされておらず、その生物学的な意義についても不明である。また、プロテインキナーゼCによるリン酸化を受け得るサイト([ST]-X-[RK])も5箇所(164-166, 225-227, 280-282, 286-288, 530-532)存在した。これらのうち特に286-288のサイトは、全てのOCTファミリータンパクにおいて共通する位置に保存されている。さらに、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列([Ala, Gly]-Xaa(4)-Gly-Lys-[Ser, Thr])も存在する。このATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列はキナーゼやrasファミリータンパク等のATP結合タンパク、あるいはGTP結合タンパク質に存在し、この部位にATP, GTPが結合することが知られている(Walker, J. E. et al. *EMBO J.*, 1, 945-951, 1982)。ABC(ATP Binding Cassette)型トランスポーターと呼ばれるトランスポーターにはこの配列が存在し、ATPを加水分解することによるエネルギーを用いて物質を輸送していることが示されている(Higgins, C. F. et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22, 571-592, 1990; Urbatsch, I. L. et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 26956-26961, 1995))。このコンセンサス配列の存在により、fls631タンパク質がATPあるいはGTP依存的な輸送を行うトランスポーターである可能性も考えられる。

【0025】

なお、塩基配列の決定は、アルカリSDS法によって調製したプラスミドDNA、またはコロニーPCRなどによるPCR産物を鋳型とし、ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With AmpliTaq DNA Polymerase,FSを用いたサイクルシーケンシング法により行い、ABI 377 DNA Sequencer (PerkinElmer社)により解読した。コロニーPCRは、ベクタープライマーであるM13 P4-22(5' CCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3' / 配列番号: 11)及びM13 P5-22(5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3' / 配列番号: 12)を含むPCR反応溶液の中に、組み換え体を持つ

コロニーを直接懸濁することにより行った。PCR反応後、増幅されたインサートDNAから、ゲル濾過法などにより未反応のプライマー、ヌクレオチド等を除き、シーケンシングの鋳型として用いた。

【0026】

〔実施例3〕 ノーザン解析

f1s631の組織分布をノーザン解析により調べた(図3)。f1s631の3'側断片(約1,100番目の塩基より後半)を、Ready-to Go DNA labelling beads (Pharmacia)を用いたランダムプライマー法により $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPでラベルし、プローブとして用いた。Multiple Tissue Northern (MTN) Blot - Human, Human III, Human IV, Human Fetal II, Human Cell line (CLONTECH)を用い、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH)中で、メーカー推奨の方法に従い、68℃でハイブリダイゼーションを行った。最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1% SDS, 50℃で行った。その結果、胎児では肝臓に、そして成人由来の臓器では、腎臓、骨髄、気管に約2.5kbの強い発現が観察された。それ以外には胎児の腎臓、肺、そして成人の骨格筋、肺、胎盤、前立腺、脾臓、脊髄に弱い発現が見られた。また、腫瘍細胞株においてもHela S3、K562、SW480、A549に発現が認められ、特にHela S3においては非常に強く発現していることが明らかとなった。

【0027】

〔実施例4〕 631RTのcDNAクローニング

f1s631の全塩基配列を用いたデータベースサーチより、ヒューマンゲノムセンターから報告されているヒト5番染色体q領域由来P1ファージクローン(P1 H24クローン。GenBank accession No.L43407, L43408, L46907, L81773, L43409)の塩基配列の一部に、f1s631の配列と非常に類似しているが、明らかに異なる配列が含まれていることを見いだした。この類似配列は、イントロンと思われる配列のため分断されているが、これを連結してみると、f1s631配列と非常に高い相同性がみられた(図4)。このことから、OCT1とOCT2の関係のような、f1s631ホモログが存在することが示唆された。そこでこのホモログのcDNAクローニングをめざし、これらのP1ファージクローンの配列より631R S4プライマー(5' GTGCTGT TGGGCTCCTTCATTTC A 3' /配列番号: 13)及び631R A1プライマー(5' AGCTGCATGA

AGAGAAGGACACTG 3' / 配列番号: 14) を作製し、ヒト成人腎臓由来polyA⁺ RNA (CLONTECH) より合成したcDNAを鋳型に、94℃で3分、(94℃で30秒、58℃で1分、72℃で2分) を35サイクル、72℃で10分という条件によるPCRを行ったところ、約900bpの断片が増幅された。この断片をpT7Blue-Tベクター (Novagen) にTAクローニング法によりサブクローニングし、塩基配列を決定したところ、全体に渡りfls631と非常に高い相同性を有することが明らかとなった。そこでこの遺伝子を631RT (fls631 Related Transporter) と命名し、さらに長いcDNAのクローニングを行った。

【0028】

新たに631R S6プライマー (5' AGCATCCTGTCTCCCTACTTCGTT 3' / 配列番号: 15) を作製し、ヒト成人腎臓由来Marathon-ReadyTM cDNA (CLONTECH) を鋳型として、94℃で2分、(94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分) を35サイクル、72℃で10分という条件のPCRで、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法 (Chenchik, A., Moqadam, F., and Siebert, P. (1995) CLONTECHniques X, 5-8) によるクローニングを試みた。その結果、約1.7kbpの断片が増幅され、これをpT7Blue-TベクターにTAクローニング法によりサブクローニングした。このクローンの塩基配列を一部決定したところ、これは631RTの3' 側断片であることが明らかとなった。以上の方法で得られた配列を連結したものを配列番号: 3 に示す。

【0029】

この配列中には460アミノ酸からなるORFがコードされていた。このORFの配列と、fls631のアミノ酸配列の比較を図5に示す。両者は全体に渡り、約72%という非常に高い相同性を示した。また631RTアミノ酸配列中にはfls631と同様に1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列が存在した。これらのことより、631RTはfls631と構造上の関連を持った新規トランスポーターである可能性が示唆された。また、631RTアミノ酸配列中にも、fls631と同様にATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列が存在した。さらに長い領域を含む631RT cDNAは、すでに得られているcDNAをプローブとして、fls631 cDNAのクローニングと同様な方法で行うことができると考えられる。

【0030】

【実施例5】 ノーザン解析

631R S4プライマー(5' GTGCTGTTGGGCTCCTTCATTTC 3' / 配列番号: 13)及び631R A1プライマー(5' AGCTGCATGAAGAGAAGGACACTG 3' / 配列番号: 14)を用いたPCRによって得られた約900bpの631RT cDNAをプローブとし、f1s631と同様にノーザン解析を行った。その結果を図6に示す。発現パターンはf1s631のパターンと重複している部分があるが、胎児組織において腎臓に非常に強い発現が見られる点が特に異なっていた。また、631RTもまたK-562, HeLaS3, SW480等の癌細胞株で強く発現していることが判明した。これらの癌細胞において、f1s631, 631RTが抗癌剤などの物質の輸送に参与している可能性が示唆される。

【0031】

【実施例6】 f1s631のヒト胎児腎臓細胞(HEK293)での強制発現と活性測定

ブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングによって得られた陽性ファージクローンより、QIAGEN Lambda Kit(QIAGEN)を用いてファージDNAを抽出した。インサートDNAをpUC18ベクターにサブクローニングした後、SmaI及びEcoRIで切り出される全ORFを含むcDNAを、哺乳類細胞用の発現ベクターであるpcDNA3(Invitrogen)のEcoRIサイトと、平滑末端化したHindIIIサイトとの間へ組み込み、発現用プラスミドDNA、「pcDNA3/631-2」を得た。プラスミドDNAは、QIAGEN PLASMID MAXI Kit(QIAGEN)を用いたアルカリ-SDS法で調製した。

【0032】

pcDNA3/631-2、及びコントロールとしてインサートを含まないpcDNA3ベクターを、リン酸カルシウム法によりヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293細胞に導入した。すなわち、プラスミドDNA10 μ g、Hepes緩衝液(137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 6mM Dextrose, 21mM Hepes pH7.1)1ml、2M CaCl₂ 62.5 μ lを混合し、30分以上室温で静置することによりリン酸カルシウム共沈物を生成させた。10cmプレート1枚あたり1.5 x 10⁶個の細胞を蒔き、24時間培養した後、先のリン酸カルシウム共沈物を加え24時間培養し、その後PBS(Phosphate buffered saline)でプレートを洗浄し、培地を加えさらに24時間培養した。

【0033】

プラスミドDNAを導入した細胞、あるいは未処理の細胞を用いて以下の手順に

従ってトランスポート実験を行った。プレートからラバーポリスマンを用いて細胞をはがし、トランスポート緩衝液(125mM NaCl, 4.8mM KCl, 5.6mM (+)-glucose, 1.2mM CaCl_2 , 1.2mM KH_2PO_4 , 1.2mM MgSO_4 , 25mM Hepes pH7.4)に懸濁し、20分間プレインキュベーションを行った。ついで各種基質のラベル体($[^{14}\text{C}]$ TEA<テトラエチルアンモニウム>(NEN)、 $[^3\text{H}]$ カルニチン<L-カルニチン ヒドロクロリド>(Amersham)、 $[^3\text{H}]$ PCG<ベンジル ペニシリン>(Amersham)、 $[^3\text{H}]$ キニジン(ARC)、 $[^3\text{H}]$ ピリラミン<メピラミン>(Amersham))を適当量添加し、37℃にて一定時間インキュベートを行った。これを、3M KCl層の上にシリコンオイルと液体パラフィンの混合物(比重=1.022)を重層して作製したシリコンレイヤー上に重層し、遠心することにより細胞を分離した。細胞の放射活性を測定し、細胞内へのトランスポート能とした。なおこの際、 1×10^6 個の細胞を1ポイントとして用いた。また、HEK293細胞の培養は、ダルベッコMEM, 10% FCS(ウシ胎児血清)を培地とし、5%二酸化炭素中、37℃で行った。

【0034】

まず、TEAを基質として用い、pcDNA3/fls631-2を導入した細胞と、未処理の細胞におけるトランスポーター能を測定した(図7)。その結果、反応時間に依存した明らかなfls631導入細胞内へのTEAの取り込みが観察された。この取り込みは、未処理細胞においては見られなかった。次に、この系にラベル体ではないTEAを添加することによるゴールドインヒビションの実験を行った(図8)。加えるゴールドのTEAの濃度に応じて明らかな見かけ上の取り込みの低下が観察された。この実験においてはインサートを含まないpcDNA3ベクターを導入した細胞(Mock)をコントロールとしたが、未処理の細胞を用いた場合と同様に、ほとんど細胞内への基質の取り込みは認められず、この取り込み現象がfls631を導入したことによることが明らかとなった。次に、fls631のTEAに対する K_m (ミカエリス定数)値を求めるために、様々な濃度の $[^{14}\text{C}]$ TEAを加えた場合の取り込み量を測定した(図9)。fls631を導入した細胞における取り込み量からMockの取り込み量を差し引いた正味の取り込み量をLineweaver-Burk逆数プロットすることにより、 K_m 値は $0.44 \pm 0.04 \text{ mM}$ であることが求められた。また反応の最大速度 V_{max} は $6.68 \pm 0.34 (\text{nmol}/3 \text{ min}/\text{mg})$ であることが求められた。次に、TEA以外の物質に対する

輸送能を検討した（図10）。有機カチオンであるカルニチン、キニジン、ピリラミンのラベル体を用い輸送能を測定したところ、Mockに対し明らかに有意な取り込み量の増加が観察され、これらの有機カチオンはf1s631の基質になりうるということが明らかとなった。しかし、有機アニオンであるPCG（ベンジルペニシリン）に対しては取り込み量の有意な増加は認めらなかった。

【0035】

【発明の効果】

本発明により、有機カチオンを輸送する新規なトランスポーターが提供された。本発明のトランスポーターは、これを介して輸送される新規なデザインの薬物の開発や、その機能異常などに起因する疾患の治療薬の開発などに有用である。

【配列表】

配列の長さ : 551

トポロジー：直鎖状

配列

1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

2 1

155	160	165	
Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe			
170	175	180	185
Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val			
	190	195	200
Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu			
	205	210	215
Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu			
	220	225	230
Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe			
	235	240	245
Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val			
250	255	260	265
Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro			
	270	275	280
Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile			
	285	290	295
Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe			
	300	305	310
Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile			
	315	320	325
Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser			
330	335	340	345
Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu			
	350	355	360
Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser			
	365	370	375
Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg			
	380	385	390

Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly
 395 400 405
 Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu
 410 415 420 425
 Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe
 430 435 440
 Ser Met Leu Tyr Val Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg
 445 450 455
 Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile
 460 465 470
 Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro
 475 480 485
 Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu
 490 495 500 505
 Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln
 510 515 520
 Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser
 525 530 535
 Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe
 540 545 550

配列番号 : 2

配列の長さ : 2135

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 147.. 1799

特徴を決定した方法 : E

配 列

CCCCGGCTTC GCGCCCCAAT TTCTAACAGC CTGCCTGTCC CCCGGGAACG TTCTAACATC	60
CTTGGGGAGC GCCCCAGCTA CAAGACACTG TCCTGAGAAC GCTGTCATCA CCCGTAGTTG	120
CAAGTTTCGG AGCGGCAGTG GGAAGC ATG CGG GAC TAC GAC GAG GTG ATC GCC	173
Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala	
1 5	
TTC CTG GGC GAG TGG GGG CCC TTC CAG CGC CTC ATC TTC TTC CTG CTC	221
Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu	
10 15 20 25	
AGC GCC AGC ATC ATC CCC AAT GGC TTC AAT GGT ATG TCA GTC GTG TTC	269
Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe	
30 35 40	
CTG GCG GGG ACC CCG GAG CAC CGC TGT CGA GTG CCG GAC GCC GCG AAC	317
Leu Ala Gly Thr Pro Glu His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn	
45 50 55	
CTG AGC AGC GCC TGG CGC AAC AAC AGT GTC CCG CTG CGG CTG CGG GAC	365
Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn Asn Ser Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp	
60 65 70	
GGC CGC GAG GTG CCC CAC AGC TGC AGC CGC TAC CGG CTC GCC ACC ATC	413
Gly Arg Glu Val Pro His Ser Cys Ser Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile	
75 80 85	
GCC AAC TTC TCG GCG CTC GGG CTG GAG CCG GGG CGC GAC GTG GAC CTG	461
Ala Asn Phe Ser Ala Leu Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu	
90 95 100 105	
GGG CAG CTG GAG CAG GAG AGC TGC CTG GAT GGC TGG GAG TTC AGC CAG	509
Gly Gln Leu Glu Gln Glu Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln	
110 115 120	

GAC GTC TAC CTG TCC ACC GTC GTG ACC GAG TGG AAT CTG GTG TGT GAG	557
Asp Val Tyr Leu Ser Thr Val Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu	
125 130 135	
GAC AAC TGG AAG GTG CCC CTC ACC ACC TCC CTG TTC TTC GTA GGC GTG	605
Asp Asn Trp Lys Val Pro Leu Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val	
140 145 150	
CTC CTC GGC TCC TTC GTG TCC GGG CAG CTG TCA GAC AGG TTT GGC AGG	653
Leu Leu Gly Ser Phe Val Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg	
155 160 165	
AAG AAC GTT CTC TTC GCA ACC ATG GCT GTA CAG ACT GGC TTC AGC TTC	701
Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe	
170 175 180 185	
CTG CAG ATT TTC TCC ATC AGC TGG GAG ATG TTC ACT GTG TTA TTT GTC	749
Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val	
190 195 200	
ATC GTG GGC ATG GGC CAG ATC TCC AAC TAT GTG GTA GCC TTC ATA CTA	797
Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu	
205 210 215	
GGA ACA GAA ATT CTT GGC AAG TCA GTT CGT ATT ATA TTC TCT ACA TTA	845
Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu	
220 225 230	
GGA GTG TGC ACA TTT TTT GCA GTT GGC TAT ATG CTG CTG CCA CTG TTT	893
Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe	
235 240 245	
GCT TAC TTC ATC AGA GAC TGG CGG ATG CTG CTG CTG GCG CTG ACG GTG	941
Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val	
250 255 260 265	
CCG GGA GTG CTG TGT GTC CCG CTG TGG TGG TTC ATT CCT GAA TCT CCC	989
Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro	

270	275	280	
CGA TGG CTG ATA TCC CAG AGA AGA TTT AGA GAG GCT GAA GAT ATC ATC			1037
Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile			
285	290	295	
CAA AAA GCT GCA AAA ATG AAC AAC ACA GCT GTA CCA GCA GTG ATA TTT			1085
Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe			
300	305	310	
GAT TCT GTG GAG GAG CTA AAT CCC CTG AAG CAG CAG AAA GCT TTC ATT			1133
Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile			
315	320	325	
CTG GAC CTG TTC AGG ACT CGG AAT ATT GCC ATA ATG ACC ATT ATG TCT			1181
Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser			
330	335	340	345
TTG CTG CTA TGG ATG CTG ACC TCA GTG GGT TAC TTT GCT CTG TCT CTG			1229
Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu			
350	355	360	
GAT GCT CCT AAT TTA CAT GGA GAT GCC TAC CTG AAC TGT TTC CTC TCT			1277
Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser			
365	370	375	
GCC TTG ATT GAA ATT CCA GCT TAC ATT ACA GCC TGG CTG CTA TTG CGA			1325
Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg			
380	385	390	
ACG CTG CCC AGG CGT TAT ATC ATA GCT GCA GTA CTG TTC TGG GGA GGA			1373
Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly			
395	400	405	
GGT GTG CTT CTC TTC ATT CAA CTG GTA CCT GTG GAT TAT TAC TTC TTA			1421
Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu			
410	415	420	425
TCC ATT GGT CTG GTC ATG CTG GGA AAA TTT GGG ATC ACC TCT GCT TTC			1469

Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe	
430 435 440	
TCC ATG CTG TAT GTC TTC ACT GCT GAG CTC TAC CCA ACC CTG GTC AGG	1517
Ser Met Leu Tyr Val Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg	
445 450 455	
AAC ATG GCG GTG GGG GTC ACA TCC ACG GCC TCC AGA GTG GGC AGC ATC	1565
Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile	
460 465 470	
ATT GCC CCC TAC TTT GTT TAC CTC GGT GCT TAC AAC AGA ATG CTG CCC	1613
Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro	
475 480 485	
TAC ATC GTC ATG GGT AGT CTG ACT GTC CTG ATT GGA ATC TTC ACC CTT	1661
Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu	
490 495 500 505	
TTT TTC CCT GAA AGT TTG GGA ATG ACT CTT CCA GAA ACC TTA GAG CAG	1709
Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln	
510 515 520	
ATG CAG AAA GTG AAA TGG TTC AGA TCT GGG AAA AAA ACA AGA GAC TCA	1757
Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser	
525 530 535	
ATG GAG ACA GAA GAA AAT CCC AAG GTT CTA ATA ACT GCA TTC	1799
Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe	
540 545 550	
TGAAAAAATA TCTACCCCAT TTGGTGAAGT GAAAAACAGA AAAATAAGAC CCTGTGGAGA	1859
AATTCGTTGT TCCCACTGAA ATGGACTGAC TGTAACGATT GACACCAAAA TGAACCTTGC	1919
TATCAAGAAA TGCTCGTCAT ACAGTAAACT CTGGATGATT CTTCCAGATA ATGTCCTTGC	1979
TTTACAAACC AACCATTCTT AGAGAGTCTC CTTACTCATT AATTCAATGA AATGGATTGG	2039
TAAGATGTCT TGAAAACATG TTAGTCAAGG ACTGGTAAAA TACATATAAA GATTAACACT	2099
CATTTCOAAT CATACAAATA CTATCCAAAT AAAAAT	2135

配列番号 : 3

配列の長さ : 460

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配 列

Glu	Pro	Gly	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Gly	Gln	Leu	Glu	Gln	Glu	Ser	
1				5					10					15	
Cys	Leu	Asp	Gly	Trp	Glu	Phe	Ser	Gln	Asp	Val	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ile
				20					25					30	
Val	Thr	Glu	Trp	Asn	Leu	Val	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Lys	Ala	Pro	Leu
				35					40					45	
Thr	Ile	Ser	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Val	Leu	Leu	Gly	Ser	Phe	Ile	Ser
				50					55					60	
Gly	Gln	Leu	Ser	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Lys	Asn	Val	Leu	Phe	Val	Thr
				65					70					75	
Met	Gly	Thr	Gln	Thr	Gly	Phe	Ser	Phe	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Lys	Asn
				80					85					90	
Phe	Glu	Met	Phe	Val	Val	Leu	Phe	Val	Leu	Val	Gly	Met	Gly	Gln	Ile
				100					105					110	
Ser	Asn	Tyr	Val	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Gly	Thr	Glu	Ile	Leu	Gly	Lys
				115					120					125	
Ser	Val	Arg	Ile	Ile	Phe	Ser	Thr	Leu	Gly	Val	Cys	Ile	Phe	Tyr	Ala
				130					135					140	
Phe	Gly	Tyr	Met	Val	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	Tyr	Phe	Ile	Arg	Asp	Trp
				145					150					155	
Arg	Met	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Thr	Met	Pro	Gly	Val	Leu	Cys	Val	Ala
				160					165					170	
Leu	Trp	Trp	Phe	Ile	Pro	Glu	Thr	Pro	Arg	Trp	Leu	Ile	Ser	Gln	Gly

180	185	190
Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala Asn		
195	200	205
Gly Val Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp		
210	215	220
Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu Arg		
225	230	235
Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp Met		
240	245	250
Thr Leu Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu		
260	265	270
His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu Val		
275	280	285
Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg		
290	295	300
Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe		
305	310	315
Met Gln Leu Val Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu Val		
320	325	330
Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr Val		
340	345	350
Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly		
355	360	365
Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe		
370	375	380
Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly		
385	390	395
Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu Ser		
400	405	410
		415

Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys
 420 425 430
 Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys Asp
 435 440 445
 Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe
 450 455 460

配列番号 : 4

配列の長さ : 1555

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配 列

TG GAG CCG GGG CGC GAC GTG GAC CTG GGG CAG CTG GAG CAG GAG AGC	47
Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Glu Ser	
1 5 10 15	
TGT CTG GAT GGC TGG GAG TTC AGT CAG GAC GTC TAC CTG TCC ACC ATT	95
Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr Ile	
20 25 30	
GTG ACC GAG TGG AAC CTG GTG TGT GAG GAC GAC TGG AAG GCC CCA CTC	143
Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu	
35 40 45	
ACA ATC TCC TTG TTC TTC GTG GGT GTG CTG TTG GGC TCC TTC ATT TCA	191
Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile Ser	
50 55 60	
GGG CAG CTG TCA GAC AGG TTT GGC CGG AAG AAT GTG CTG TTC GTG ACC	239
Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val Thr	
65 70 75	

ATG GGC ACG CAG ACA GGC TTC AGC TTC CTG CAG ATC TTC TCG AAG AAT	287
Met Gly Thr Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys Asn	
80 85 90 95	
TTT GAG ATG TTT GTC GTG CTG TTT GTC CTT GTA GGC ATG GGC CAG ATC	335
Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile	
100 105 110	
TCC AAC TAT GTG GCA GCA TTT GTC CTG GGG ACA GAA ATT CTT GGC AAG	383
Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys	
115 120 125	
TCA GTT CGT ATA ATA TTC TCT ACG TTA GGA GTG TGC ATA TTT TAT GCA	431
Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala	
130 135 140	
TTT GGC TAC ATG GTG CTG CCA CTG TTT GCT TAC TTC ATC CGA GAC TGG	479
Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp	
145 150 155	
CGG ATG CTG CTG GTG GCG CTG ACG ATG CCG GGG GTG CTG TGC GTG GCA	527
Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val Ala	
160 165 170 175	
CTC TGG TGG TTC ATC CCT GAG ACC CCC CGA TGG CTC ATC TCT CAG GGA	575
Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Thr Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly	
180 185 190	
CGA TTT GAA GAG GCA GAG GTG ATC ATC CGC AAG GCT GCC AAA GCC AAT	623
Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala Asn	
195 200 205	
GGG GTT GTT GTG CCT TCC ACT ATC TTT GAC CCG AGT GAG TTA CAA GAC	671
Gly Val Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp	
210 215 220	
CTA AGT TCC AAG AAG CAG CAG TCC CAC AAC ATT CTG GAT CTG CTT CGA	719
Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu Arg	

225	230	235	
ACC TGG AAT ATC CGG ATG GTC ACC ATC ATG TCC ATA ATG CTG TGG ATG			767
Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp Met			
240	245	250	255
ACC TTA TCA GTG GGC TAT TTT GGG CTT TCG CTT GAT ACT CCT AAC TTG			815
Thr Leu Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu			
	260	265	270
CAT GGG GAC ATC TTT GTG AAC TGC TTC CTT TCA GCG ATG GTT GAA GTC			863
His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu Val			
	275	280	285
CCA GCA TAT GTG TTG GCC TGG CTG CTG CTG CAA TAT TTG CCC CGG CGC			911
Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg			
	290	295	300
TAT TCC ATG GCC ACT GCC CTC TTC CTG GGT GGC AGT GTC CTT CTC TTC			959
Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe			
	305	310	315
ATG CAG CTG GTA CCC GTG GAC TTG TAT TAT TTG GCT ACA GTC CTG GTG			1007
Met Gln Leu Val Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu Val			
	320	325	330
ATG GTG GGC AAG TTT GGA GTC ACG GCT GCC TTT TCC ATG GTC TAC GTG			1055
Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr Val			
	340	345	350
TAC ACA GCC GAG CTG TAT CCC ACA GTG GTG AGA AAC ATG GGT GTG GGA			1103
Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly			
	355	360	365
GTC AGC TCC ACA GCA TCC CGC CTG GGC AGC ATC CTG TCT CCC TAC TTC			1151
Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe			
	370	375	380
GTT TAC CTT GGT GCC TAC GAC CGC TTC CTG CCC TAC ATT CTC ATG GGA			1199

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly
 385 390 395
 AGT CTG ACC ATC CTG ACA GCC ATC CTC ACC TTG TTT CTC CCA GAG AGC 1247
 Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu Ser
 400 405 410 415
 TTC GGT ACC CCA CTC CCA GAC ACC ATT GAC CAG ATG CTA AGA GTC AAA 1295
 Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys
 420 425 430
 GGA ATG AAA CAC AGA AAA ACT CCA AGT CAC ACA AGG ATG TTA AAG GAT 1343
 Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys Asp
 435 440 445
 GGT CAA GAA AGG CCC ACA ATC CTT AAA AGC ACA GCC TTC TAACATCGCT 1392
 Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe
 450 455 460
 TCCAGTAAGG GAGAACTGA AGAGGAAAGA CTGTCTTGCC AGAAATGGCC AGCTTGTGCA 1452
 GACCGAGTCC TTCAGTGACA AAAGGCCTTT GCTGTTTGTC CTCTTGACCT GTGTCTGACT 1512
 TGCTCCTGGA TGGGCACCCA CACTCAGAGG CTACATATGG CCC 1555

配列番号 : 5

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

CTAATACGAC TCACTATAGG GC 22

配列番号 : 6

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

TGTAGCGTGA AGACGACAGA A

21

配列番号： 7

配列の長さ： 22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

TCGAGCGGCC GCCCGGGCAG GT

22

配列番号： 8

配列の長さ： 22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

AGGGCGTGGT GCGGAGGGCG GT

22

配列番号： 9

配列の長さ： 20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

CTTTTGAGCA AGTTCAGCCT

20

配列番号 : 10

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

AGAGGTGGCT TATGAGTATT TCTT

24

配列番号 : 11

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

CCAGGGTTTT CCCAGTCACG AC

22

配列番号 : 12

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

TCACACAGGA AACAGCTATG AC

22

配列番号 : 13

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

GTGCTGTTGG GCTCCTTCAT TTCA

24

配列番号 : 14

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

AGCTGCATGA AGAGAAGGAC ACTG

24

配列番号 : 15

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

AGCATCCTGT CTCCTACTT CGTT

24

【図面の簡単な説明】

【図1】

OCTファミリータンパク質間のアミノ酸配列の比較を示す。図中のクローン名の頭の「h」はヒト由来を、「m」はマウス由来を、「r」はラット由来を示す。

【図2】

OCTファミリータンパク質の疎水性プロットを示す。kyte&Doolittleの計算式による。Windowサイズは9アミノ酸である。

【図3】

fls631のノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

【図4】

第5番染色体q領域由来のfls631類似配列(5q Genome)と、fls631配列の比較を示す。

【図5】

fls631と631RTのアミノ酸配列の比較を示す。糖トランスポーターのコンセンサス配列に一致する配列を「+」で、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列に一致する配列を「*」で示す。

【図6】

631RTのノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

【図7】

fls631のTEAの吸収活性を示す。白丸は未処理の細胞、黒丸はfls631を導入した細胞を示す。

【図8】

図7の実験系に対するコールドTEAの添加による影響を示す。図中の黒丸はfls631を導入した細胞、白丸はインサートを含まないベクターを導入した細胞、白三角は黒丸の値から白丸の値を差し引いた、正味のfls631による取り込み量を指す。

【図9】

fls631におけるTEA吸収活性のTEA濃度依存性を示す。

【図10】

fls631を導入した細胞におけるTEA以外の物質の吸収活性を示す図である。

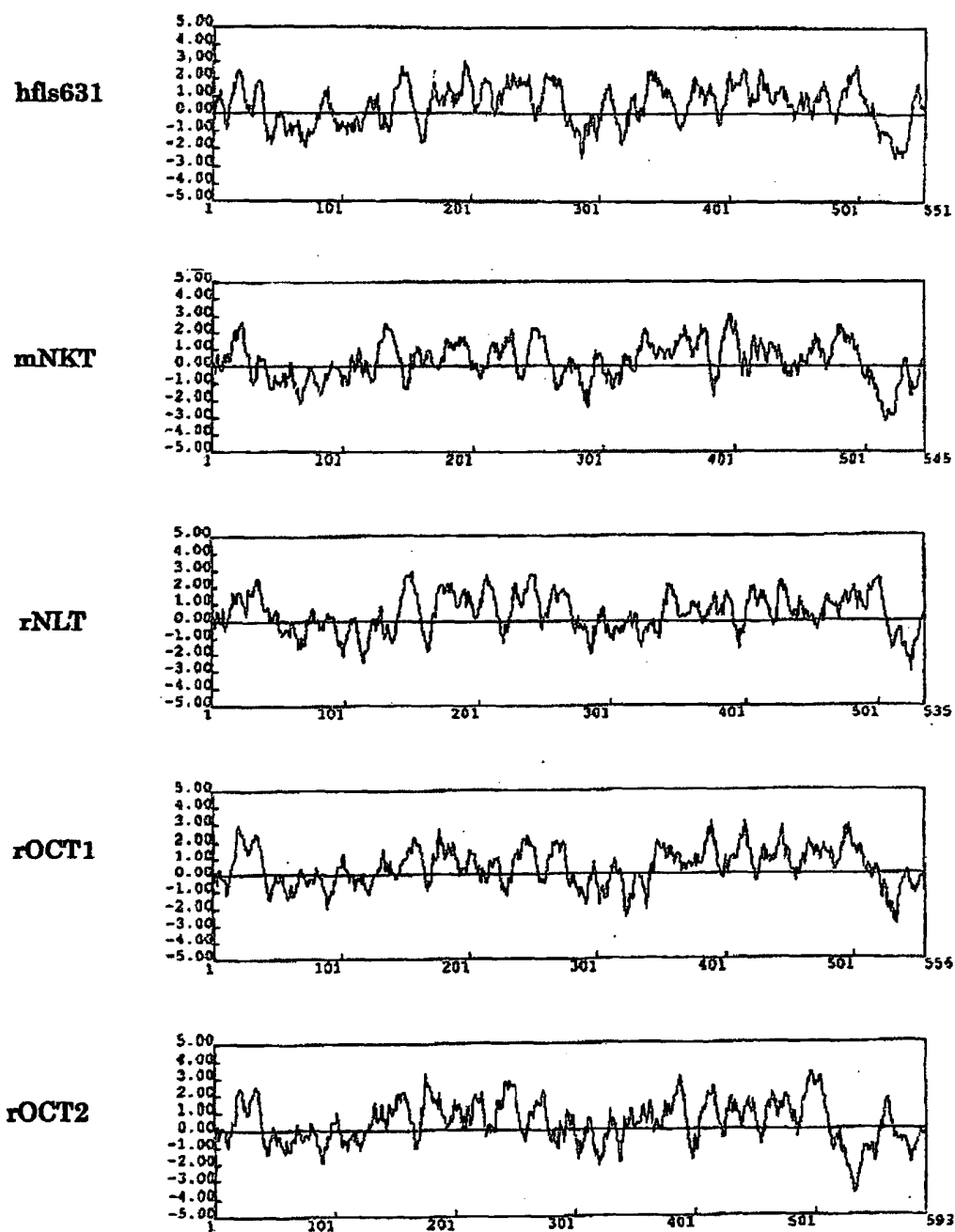
【書類名】

【図 1】

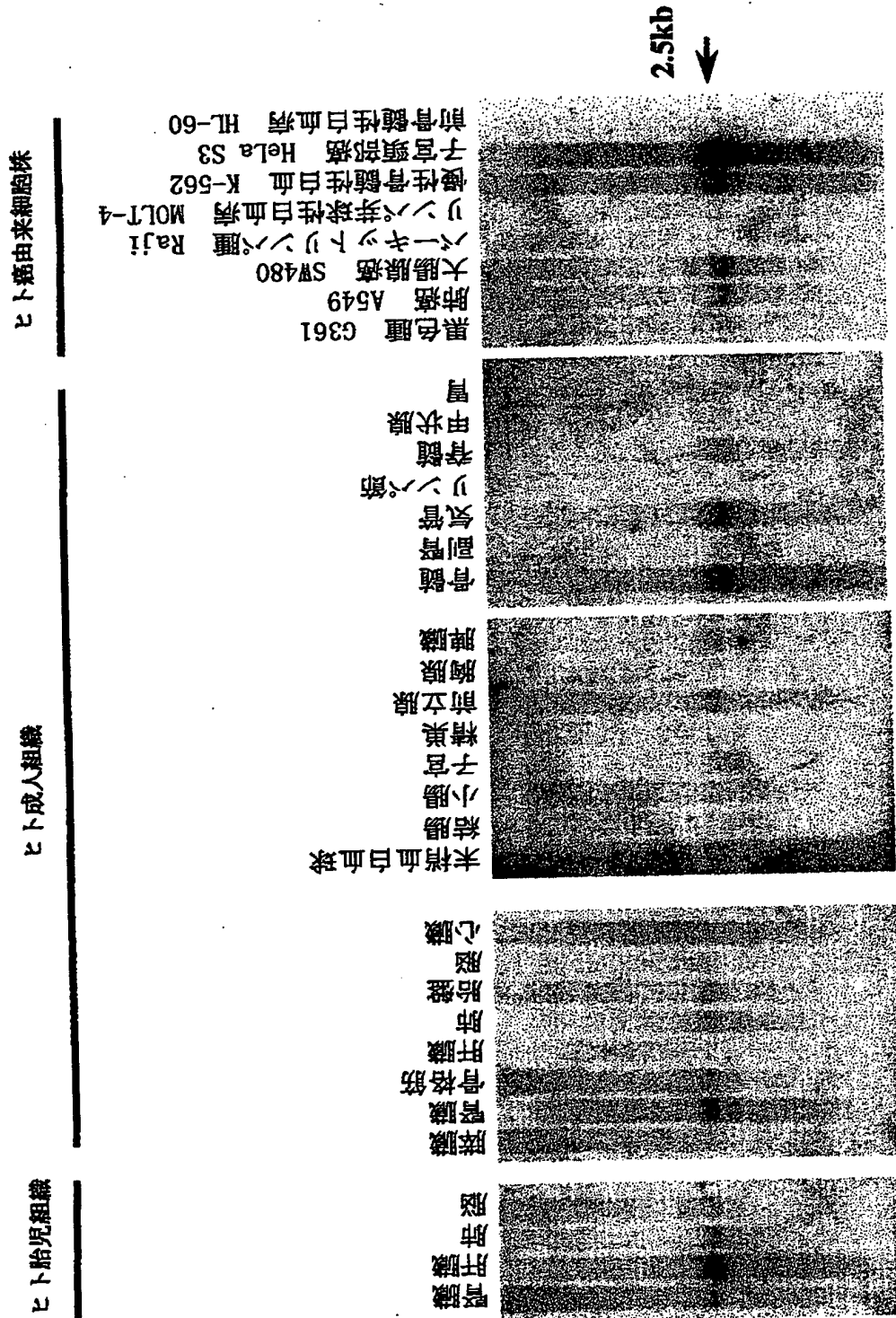
図面

h71:631	1	h71:631	50	338	385
h71:631	1	h71:631	49	339	386
h71:631	1	h71:631	49	340	387
h71:631	1	h71:631	50	341	388
h71:631	1	h71:631	50	342	389
h71:631	61	h71:631	91	343	390
h71:631	60	h71:631	85	344	391
h71:631	50	h71:631	91	345	392
h71:631	51	h71:631	100	346	393
h71:631	51	h71:631	100	347	394
h71:631	92	h71:631	141	348	395
h71:631	86	h71:631	127	349	396
h71:631	92	h71:631	141	350	397
h71:631	101	h71:631	148	351	398
h71:631	101	h71:631	148	352	399
h71:631	142	h71:631	191	353	400
h71:631	128	h71:631	177	354	401
h71:631	142	h71:631	191	355	402
h71:631	149	h71:631	198	356	403
h71:631	149	h71:631	198	357	404
h71:631	192	h71:631	241	358	405
h71:631	178	h71:631	225	359	406
h71:631	192	h71:631	240	360	407
h71:631	199	h71:631	247	361	408
h71:631	199	h71:631	247	362	409
h71:631	242	h71:631	291	363	410
h71:631	227	h71:631	276	364	411
h71:631	241	h71:631	290	365	412
h71:631	248	h71:631	297	366	413
h71:631	248	h71:631	297	367	414
h71:631	292	h71:631	335	368	415
h71:631	277	h71:631	326	369	416
h71:631	291	h71:631	338	370	417
h71:631	298	h71:631	341	371	418
h71:631	298	h71:631	341	372	419

【図2】



【図3】



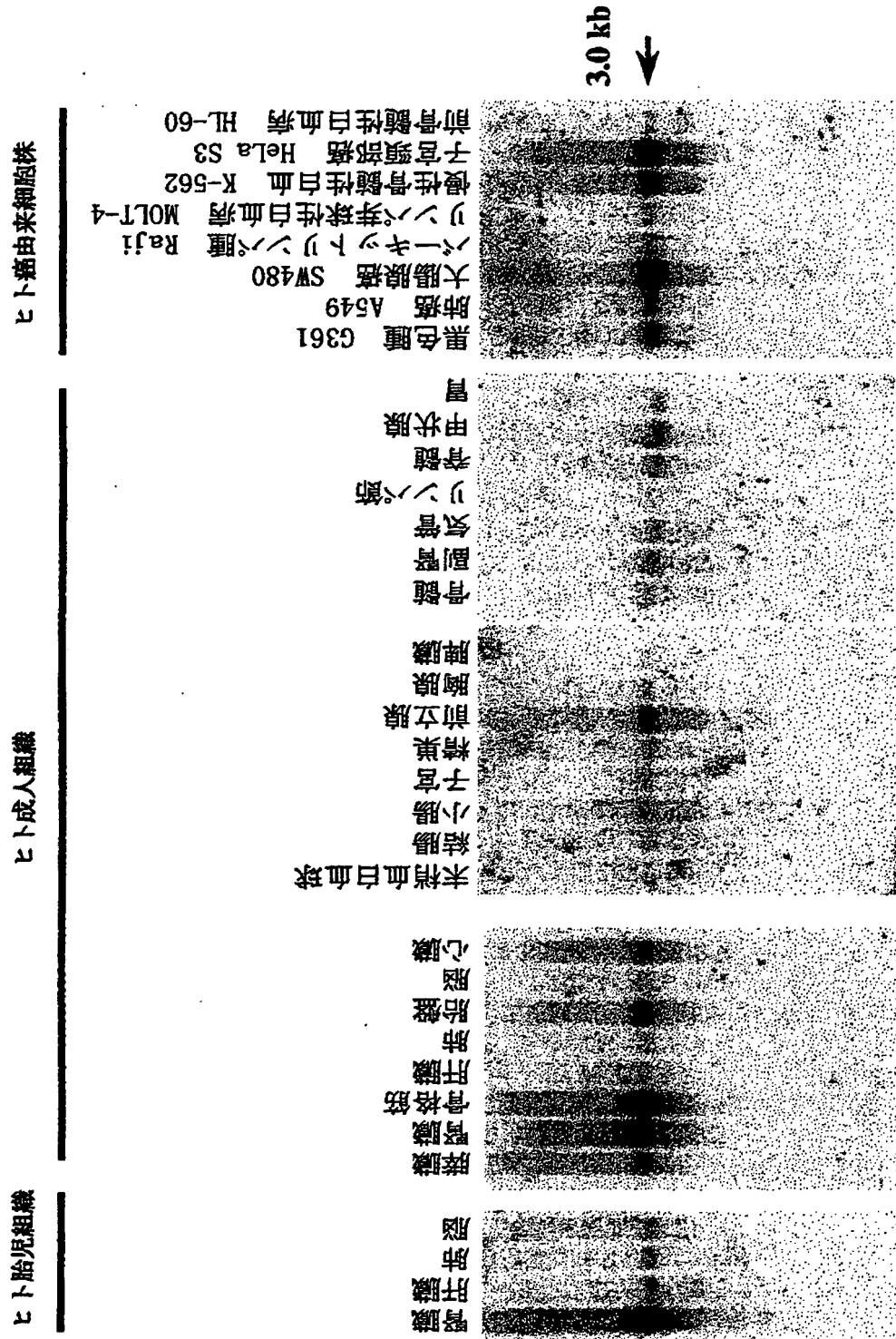
【图4】

	10	20	30	40	50	60
5q Genome	GGATGACCATATCAGTGGGCTATTTTGGGCTTTCGCTTGATACTCCTAACTTGCATGGGG					
X:::	:	: : : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
f1s631	GGATGCTGACCTCAGTGGGTACTTTGCTCTGTCTCTGGATGCTCCTAATTACATGGAG					
	1200	1210	1220	1230	1240	1250
	70	80	90	100	110	120
5q Genome	ACATCTTTGTGAAGTCTTCCTTTCAGCGATGGTTGAAGTCCCAGCATATGTGTTGGCCT					
:	::	: : : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
f1s631	ATGCCTACCTGAAGTGTTCCTCTCTGCCTTGATTGAAATCCAGCTTACATTACAGCCT					
	1260	1270	1280	1290	1300	1310
	130	140	150	160	170	180
5q Genome	GGCTGCTGCTGCAATATTTGCCCGGGCGCTATTCCATGGCCACTGCCCTCTTCCTGGGTG					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
f1s631	GGCTGCTATTGCCAACGCTGCCAGGCGTTATATCATAGCTGCAGTACTGTTCTGGGGAG					
	1320	1330	1340	1350	1360	1370
	190	200	210	220	230	240
5q Genome	GCAGTGTCTTCTCTTCATGCAGCTGGTACCCNNGACTTGTATTATTTGGCTACAGTCC					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
f1s631	GAGGTGTGCTTCTCTTCATTCAACTGGTACCTGTGGATTATTACTTCTTATCCATTGGTC					
	1380	1390	1400	1410	1420	1430
	250	260	270	280	290	300
5q Genome	TGGTGATGGTGGGCAAAGTTTGGAGTCACGGCTGCCTTTTCCATGGTCTACGTGTACACAG					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
f1s631	TGGTCATGCTGGGAAAATTTGGGATCACCTCTGCTTTCTCCATGCTGTATGTCTTCACTG					
	1440	1450	1460	1470	1480	1490
	310	320	330	340	350	360
5q Genome	CCGAGCTGTATCCACAGTGGTGAGAAACATGGGTGTGGGAGTCAGCTCCACAGCATCCC					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
f1s631	CTGAGCTTACCCAACCCTGGTCAGGAACATGGCGGTGGGGGTACATCCACGGCCTCCA					
	1500	1510	1520	1530	1540	1550
	370	380	390	400		
5q Genome	GCCTGGGCAGCATCCTGTCTCCCTACTTCGTTTACCTTGGT					
:	: : : : : :	: : : : : :	: : : : : X	:		
f1s631	GAGTGGGCAGCATATTGCCCCCTACTTTGTTTACCTCGGT					
	1560	1570	1580	1590		

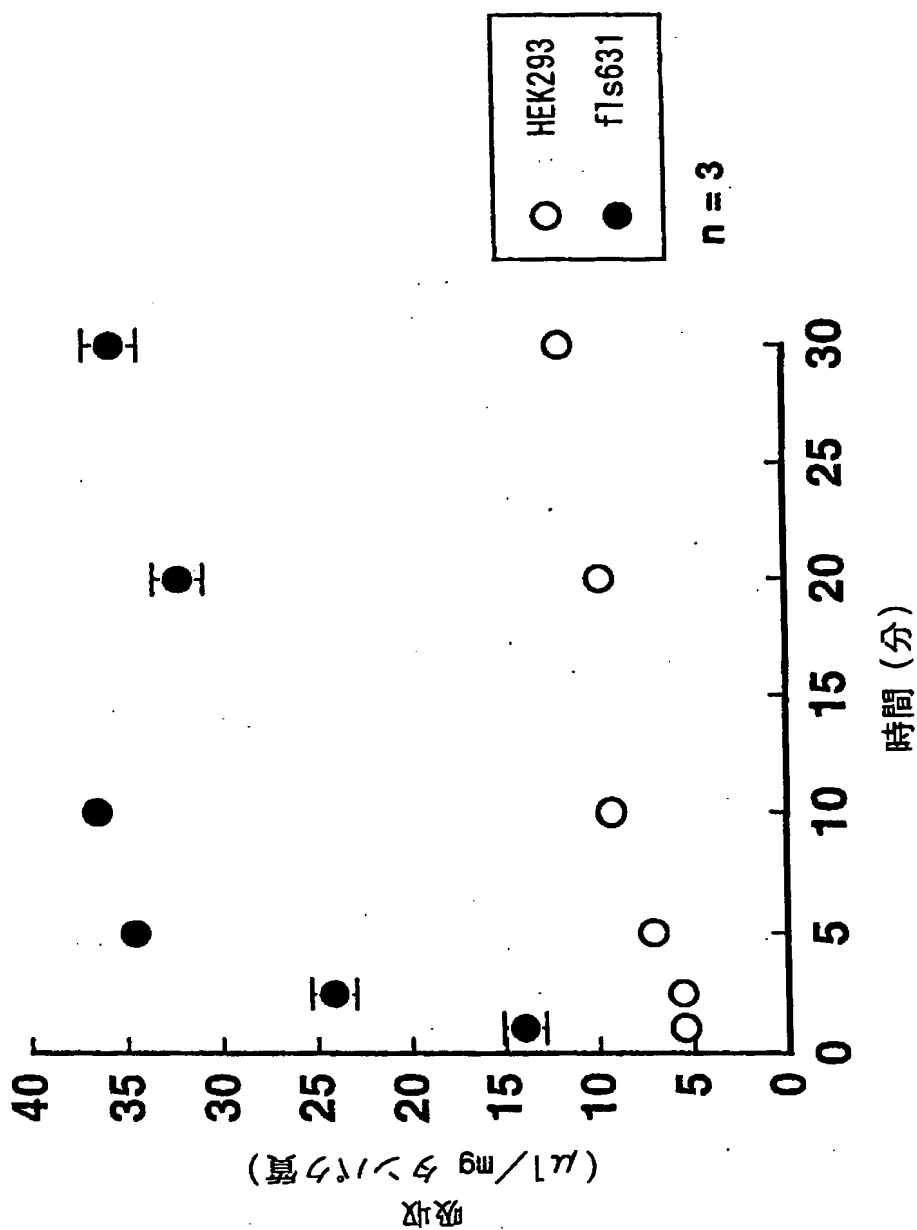
【図5】

	10	20	30	40	50	
f1s631	MRDYDEVIAF	LGWGPFFQRL	IFFLLSASII	PNGFNGMSVY	FLAGTPEHRC	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	60	70	80	90	100	
f1s631	RVPDAANLSS	AWRNNSVPLR	LRDGREVPHS	CSRYRLATIA	NFSALGLD	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	110	120	130	140	150	
f1s631	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	160	170	180	190	200	
f1s631	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	210	220	230	240	250	
f1s631	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	260	270	280	290	300	
f1s631	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	310	318	328	338	348	
f1s631	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	358	368	378	388	398	
f1s631	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	408	418	428	438	448	
f1s631	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	458	468	478	488	498	
f1s631	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	
	508	518	528	535	545	551
f1s631	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS	IVSIVSIVSIVSIVS
631RT	-----	-----	-----	-----	-----	-----

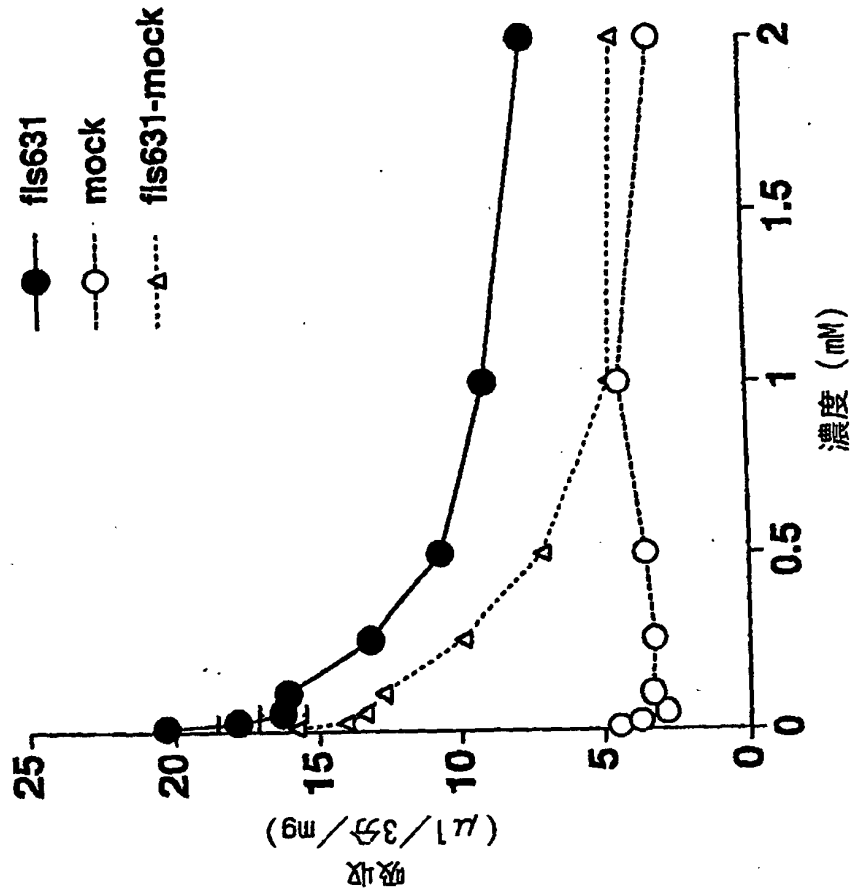
【図 6】



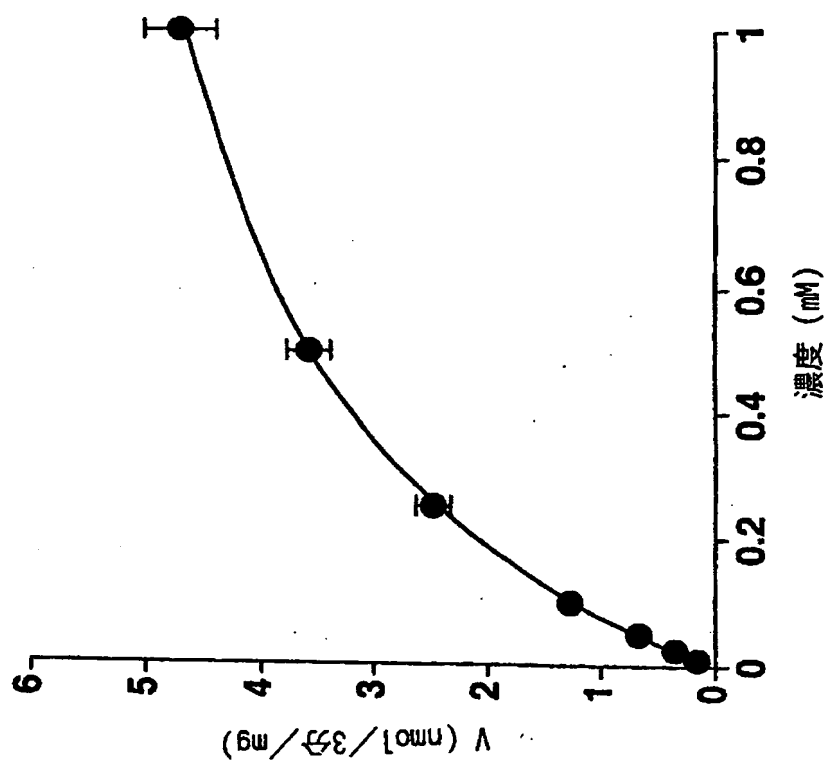
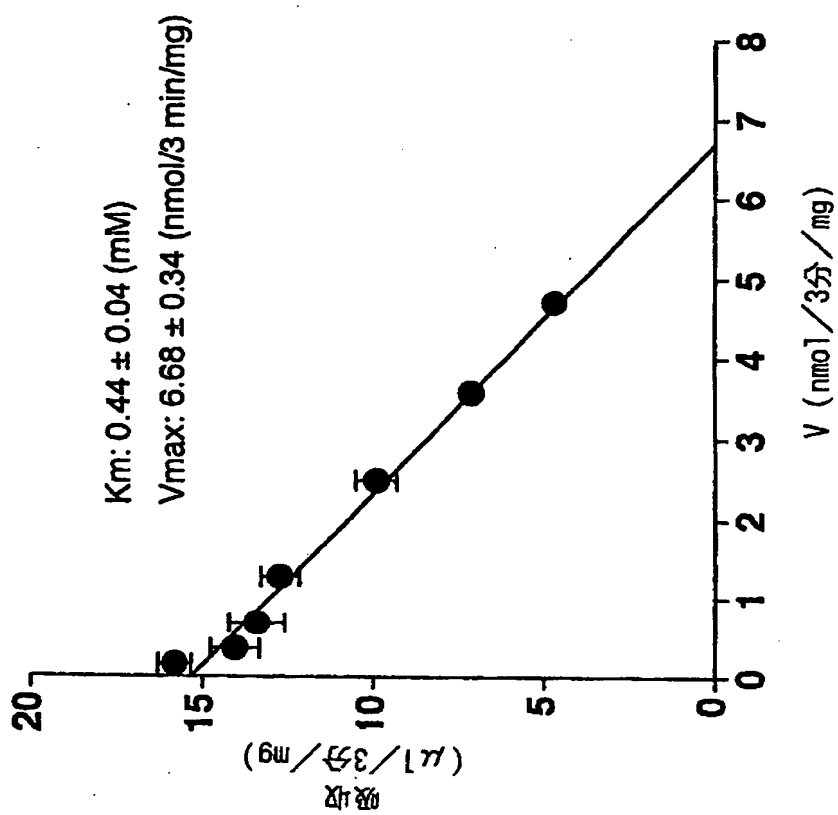
【図 7】



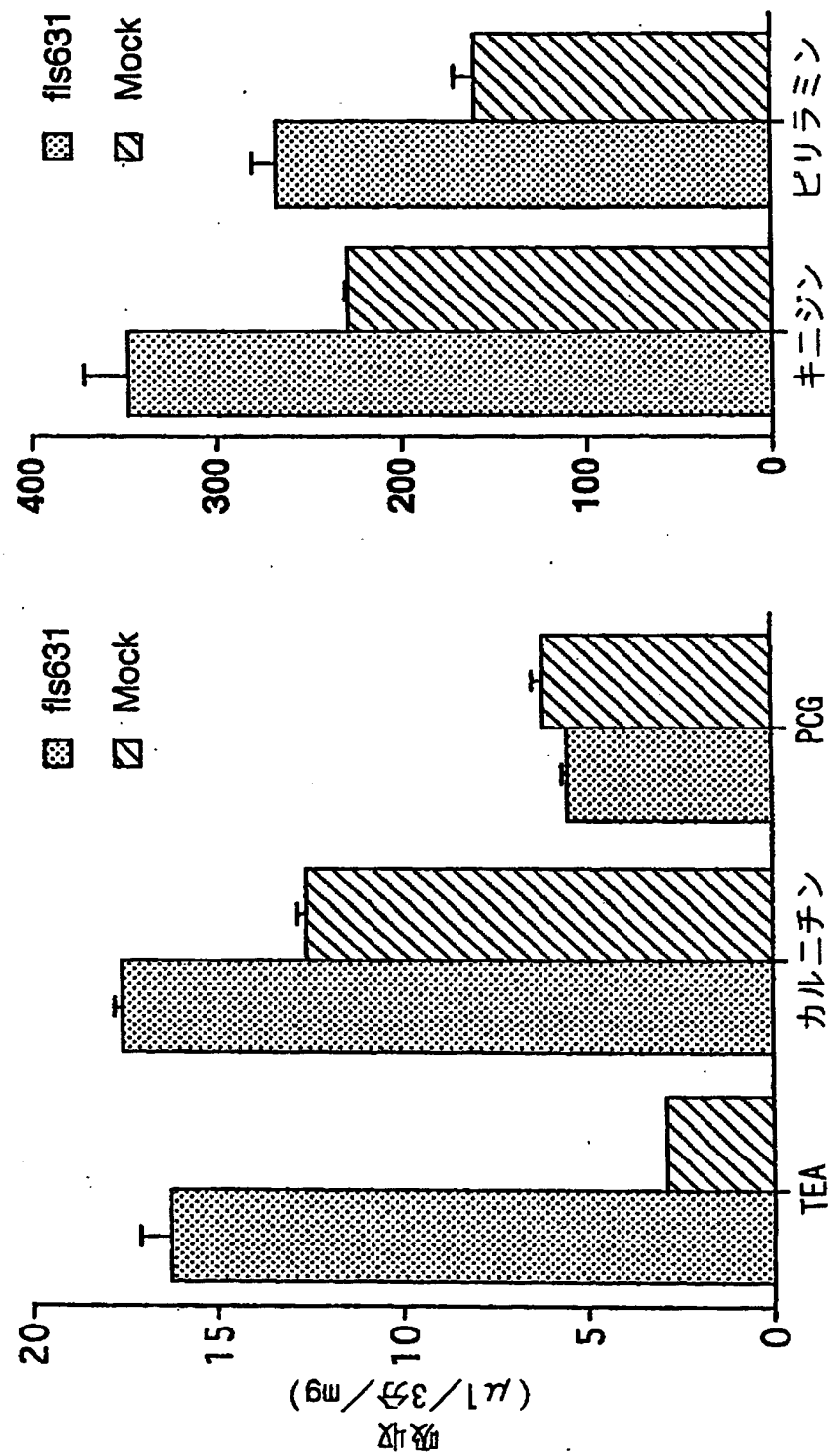
【図 8】



【図9】



【図10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なトランスポーターを提供することを課題とする。

【解決手段】 胎児遺伝子 (fetal gene) ライブラリーの、ランダムシーケンシングによるスクリーニングを行い、既知の有機カチオントランスポーターファミリータンパクと有意な相同性を示す未知の遺伝子の存在を見いだした。この遺伝子のクローニングを行い、その構造の解析を行った結果、該遺伝子が全体に渡り有機カチオントランスポーターファミリータンパク質と非常に高い相同性を有する新規なタンパク質をコードしていることを見いだした。さらに、単離した遺伝子がコードするタンパク質のトランスポーター活性を検討した結果、該タンパク質が種々の有機カチオンのトランスポーターとして機能することを見いだした。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

596102791

【住所又は居所】

茨城県新治郡新治村永井153番地2

【氏名又は名称】

株式会社中外分子医学研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日	1996年 7月15日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県新治郡新治村永井153番地2
氏 名	株式会社中外分子医学研究所